

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁵ : C12N 9/02		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 90/05181 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 17. Mai 1990 (17.05.90)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/AT89/00099 (22) Internationales Anmeldedatum: 6. November 1989 (06.11.89) (30) Prioritätsdaten: A 2734/88 7. November 1988 (07.11.88) AT (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): CL-PHARMA AKTIENGESELLSCHAFT [AT/AT]; St. Peter Straße 25, A-4021 Linz (AT). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : JUNGBAUER, Alois [AT/AT]; Skraupstr. 24/36/19, A-1210 Wien (AT). UHL, Karola [AT/AT]; Lienfeldergasse 44/11, A-1160 Wien (AT). SCHÖNHOFER, Wolfgang [AT/AT]; Teichgasse 1/2/21, A-1160 Wien (AT). STEINDL, Franz [AT/AT]; Koppstraße 69/3/23, A-1160 Wien (AT). SKI-AS, Marlies [AT/AT]; Dempschergasse 5/14, A-1180 Wien (AT).			(74) Anwälte: ITZE, Peter usw. ; Amerlingstraße 8, A-1061 Wien (AT). (81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), BE (europäisches Patent), CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), DK, FI, FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), HU, IT (europäisches Patent), JP, KR, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), NO, SE (europäisches Patent), SU, US. Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>
(54) Title: PURIFICATION OF Cu/Zn SUPEROXIDEDISMUTASE (54) Bezeichnung: REINIGUNG VON Cu/Zn-SUPEROXIDDISMUTASE (57) Abstract <p>In a process for isolating and purifying Cu/Zn superoxidedismutase (Cu/Zn-SOD), the foreign proteins are removed from the Cu/Zn-SOD by hydrophobic interaction chromatography (HIC), if necessary after suitable preliminary purification. The product obtained can be readily processed.</p> (57) Zusammenfassung <p>Bei einem Verfahren zur Isolierung und Reinigung von Cu/Zn-Superoxiddismutase (Cu/Zn-SOD) wird zwecks Erzielung eines leicht weiterverarbeitbaren Präparates, gegebenenfalls nach entsprechender Vorreinigung, die Cu/Zn-SOD durch Hydrophobic Interaction Chromatographie (HIC) von Fremdproteinen getrennt.</p>			

BEST AVAILABLE COPY

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	ES	Spanien	ML	Mali
AU	Australien	FI	Finnland	MR	Mauritanien
BB	Barbados	FR	Frankreich	MW	Malawi
BE	Belgien	GA	Gabon	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GB	Vereinigtes Königreich	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	RO	Rumänien
BJ	Benin	IT	Italien	SD	Sudan
BR	Brasilien	JP	Japan	SE	Schweden
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SN	Senegal
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SU	Sowjet Union
CG	Kongo	LI	Liechtenstein	TD	Tschad
CH	Schweiz	LK	Sri Lanka	TG	Togo
CM	Kamerun	LU	Luxemburg	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DE	Deutschland, Bundesrepublik	MC	Monaco		
DK	Dänemark	MG	Madagaskar		

REINIGUNG VON Cu/Zn-SUPEROXIDDISMUTASE

EINLEITUNG

5

1.1. Die biochemischen Eigenschaften der Cu/Zn-Superoxiddismutase

Die Cu/Zn Superoxiddismutase, im folgenden Cu/Zn-SOD
10 genannt, (E.C. 1.15.1.1) ist ein Metalloprotein; das auch
unter dem Namen Erythrocyt, Haemocytein und Cyto-
cytein bekannt ist. Die humane Cu/Zn Superoxiddismutase
besteht aus 2 Untereinheiten, die nicht kovalent miteinan-
der verbunden sind. Die natürlich vorkommende humane SOD
15 ist am N-Terminus acetyliert und besteht aus 153 Amino-
säuren. Pro Molekül Cu/Zn-SOD sind in der Regel 2 Kupfer
und 2 Zinkionen gebunden. Die Cu/Zn-SOD besitzt eine
charakteristische Absorptionsmaximum bei 265 nm. Nach
Entfernung des Kupfers und Zinks durch Chelatbildner ver-
20 schwindet dieses Absorptionsmaximum. Die Superoxiddismutase
ist ein thermostabiles und sehr gut wasserlösliches Enzym.
Eine gewisse Widerstandsfähigkeit gegenüber proteolytischen
Abbau wird ihr auch zugeschrieben. Bei höheren Temperaturen
(82 °C und 100 °C) entstehen verschiedene Konformationen,
25 die calorimetrisch und durch Bindungsstudien festgestellt
wurden. Diese Eigenschaft wird auch in HPLC und
Elektrophorese beobachtet (1).

30 1.2. Biologische Bedeutung der Cu/Zn-Superoxiddismutase

Üblicher Weise werden rote Blutkörperchen als Ausgangsma-
terial für die Gewinnung der Cu/Zn-Superoxiddismutase
herangezogen. Die biologische Bedeutung der Cu/Zn-SOD liegt
35 im Abfangen von freien Superoxidradikalen, die bei ver-
schiedensten Reaktionen im Organismus frei gesetzt werden.

ERSATZBLATT

Aus diesem Grund werden der Cu/Zn-SOD auch antiinflammatorische Eigenschaften zugeschrieben (9). Die bovine Cu/Zn-SOD wird bereits zur Behandlung von Osteoarthritis verwendet. Ebenso dürfte SOD eine Verstärkerwirkung für plasminogen-aktivierende Enzyme bei der Reperfusion besitzen (10). Weiters scheint SOD die Lagerungsfähigkeit von den nach der Explantation zum Zwecke einer späteren Transplantation zu stabilisieren (11).

10

1.3. Reinigungsverfahren für Erythrozyten SOD und SOD tierischem Gewebe und Zellkultur

Die konventionellen Reinigungsverfahren für SOD beruhen auf einer Lyse der Erythrozyten, meist eine Osmolyse und einer Extraktion der SOD mit Chloroform und Ethanol. Diese Prozedur wird auch Tsuchihaskiprozedur (M. Tsuchihaski, Biochem. Zeitschrift, 140, 65-72, 1923) genannt. Dieser Rohextrakt wird dann chromatographisch mit Ionentauscherchromatographie weiter gereinigt.

Bei Erythrozytenkonzentraten als Ausgangsmaterial kann anstatt der Extraktion eine Hitzepräzipitation eingesetzt werden, um Hämoglobin zu entfernen.

Diese Methode (A. Gärtner et al. Biochem.J. 1984; 221, 549-551) eignet sich, weil humane Erythrozyten-SOD hitzestabil ist. Eine Dialyse nach der Lyse der Erythrozyten wie bei Gärtner et.al. beschrieben, ist nicht notwendig. Das Erythrozytenkonzentrat wird einem Gefrier-
tauzyklus unterworfen und durch Zugabe von destilliertem Wasser lysiert. Das Lysat wird durch Zugabe von 80 °C heißem Wasser auf 70°C erhitzt und eine Stunde heißgehalten und danach rasch auf Zimmertemperatur abgekühlt. Das Präzipitat wird durch Zentrifugation entfernt. Wenn bei ca. 15 000 g zentrifugiert wird, entfällt ein zusätzlicher
Filtrationsschritt, der für eine anschließende Anionentauscherchromatographie notwendig wäre. Die im Überstand zurückbleibende Cu/Zn SOD wird weiterverarbeitet.

ERSATZBLATT

1.4. Rekombinante Superoxiddismutase

5

Die Cu/Zn-SOD wurde in einer Reihe von Wirtszellen wie E.Coli, Hefe und tierischen Zellen kloniert (1-5). Je nach Verwendung von verschiedenen Wirtszellen wird ein acetyliertes oder nicht acetyliertes Protein exprimiert.

10 Die für E.coli und Hefe beschriebenen Systeme scheiden das Enzym nicht in das Kulturmedium aus. Bis zu 60 % des gesamten synthetisierten Proteins besteht aus SOD. Die tierischen Zellen scheiden die rekombinante humane Cu/Zn-SOD (rh-SOD) ins Kulturmedium aus.

15

1.5. Reinigungsverfahren für rekombinante SOD

Ein sehr häufig beschriebener Reinigungsschritt ist die Chromatographie mit DEAE-Sephacel oder DEAE-Cellu-
20 losen. Das Homogenat wird geklärt und durch eine Ammonsulfatfällung vorgereinigt. Nach Bedarf werden noch weitere Schritte zur Entfernung von DNA bzw. Pyrogenen integriert. Hartmann et.al. (2) reinigen den dialysierten Ammonsulfatfällungsüberstand mit einer Anionentauscherchromatographie (DEAE-Sephacel). Um die gewünschte Reinheit
25 zu erhalten, wird das Eluat rechromatographiert. Die Fraktionen werden mittels Ultrafiltration aufkonzentriert und mittels Gelfiltration entsalzt. Die Gradientenelution bewirkt, daß ein homogenes Material erhalten
30 wird.

Auch die Immunaффinitätschromatographie mit monoklonalen Anti-human-SOD-Antikörpern wird zur Reinigung rekombinanter SOD herangezogen. Ebenso eignet sich die Affinitätschromatographie mit Heparin-Sepharose zur Reinigung von
35 rekombinanter SOD (3). Vom Prinzip her dürften diese Methoden auch zur Reinigung der natürlich vorkommenden SOD geeignet sein.

ERSATZBLATT

1.6. Testsysteme für SOD

- 5 Die Testsysteme zum Nachweis der enzymatischen Aktivität von SOD beruhen auf dem Prinzip einer Negativbestimmung. Zuerst werden Superoxid Radikale generiert. Die Radikalgenerierung kann enzymatisch, chemisch oder mit UV-Licht erfolgen. Die SOD fängt einen Teil der freien Radikale ab.
- 10 Die Verbleibenden werden durch einen Indikatorradikalfänger abgefangen, dessen Reaktionsprodukte werden colorimetrisch, photometrisch, polarographisch oder mittels Lumineszenzmessung ausgewertet. Die Bestimmung der SOD aus Rohextrakten von Mikroorganismen oder Geweben ist sehr
- 15 störanfällig. Der immunologische Nachweis auf ELISA Basis funktioniert auch in Rohextrakten von Mikroorganismen.

BESCHREIBUNG DER REINIGUNGSVERFAHREN

- 20 Die eigentliche Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Isolierung und Reinigung von Cu/Zn-SOD. Der Erfindung liegt die Aufgabe zu Grunde, daß SOD gewonnen aus tierischen Geweben, Flüssigkeiten, transformierten Mikroorganismen oder transformierten tierischen
- 25 Zellen zu einem von Begleitproteinen und anderen Verunreinigung zubefreien. Erfindungsgemäß wird, gegebenenfalls nach entsprechender Vorreinigung, die Cu/Zn-SOD durch Hydrophobic Interaction Chromatographie (HIC) von Fremdproteinen getrennt. Dadurch
- 30 wird ein SOD-Produkt erhalten, das leicht zu einem Enzympräparat verarbeitet werden kann, das dann als Therapeutikum einsetzbar ist. Bevorzugt kann die durch HIC von Fremdproteinen getrennte Cu/Zn-SOD mittels Metallchelatchromatographie oder Ionentauscherchromato-
- 35 graphie nachgereinigt werden, wodurch das Präparat besonders rein erhalten wird und direkt als Therapeutikum einsetzbar ist.

ERSATZBLATT

In dieser gegenständlichen Erfindung erfüllt die HIC in idealer Weise die Voraussetzung für einen technischen Prozeß, der zur Produktion von Biologika zum Einsatz in der human Medizin geeignet ist. Neben der Reinigung und
5 Entfernung von Fremdproteinen werden auch Pyrogene und DNA stark abgereichert.

Da die Cu/Zn-SOD in hohen Ammonsulfatkonzentrationen löslich ist, erfüllt sie eine wichtige Voraussetzung für die HIC. Pyrogene, als fiebererregende Substanzen dürfen
10 nur in Spuren in Pharmazeutika, die parental verabreicht werden, vorhanden sein. Der Wirtstamm für die rekombinante SOD, E.coli produziert von sich aus Lipopolysacchride, die als Hauptvertreter der Pyrogene anzusehen sind. Hartmann et.al. müssen in ihrer Reinigungsprozedur einen
15 zusätzlichen Schritt zur Entfernung von Pyrogenen und DNA durchführen.

In der gegenständlichen Erfindung ist jedoch eine starke Pyrogenreduktion durch die HIC selbst gewährleistet.

Ebenso wird die DNA entfernt, die bei Verwendung von
20 gentechnisch erzeugten Wirksubstanz einen bestimmten Schwellenwert nicht überschreiten darf. Aus diesen Gründen erfüllt die HIC in der gegenständlichen Erfindung in idealer Weise die Voraussetzung für die Produktion von SOD, die parenteral verabreicht wird.

25 Die von Arai et. al. (15) beschriebene immunaффinitätschromatographische Reinigung hat zwar den Vorteil, daß sie sehr spezifisch und gleichzeitig universell einsetzbar ist. In der Unstabilität des IgG als Liganden durch proteolytischen Abbau ist eine nicht unerhebliche
30 Problematik bei der Reinigung von pharmazeutischen Wirksubstanzen gelegen. Vorreinigungsschritte, die ein chromatographisches oder ähnlich effektives Verfahren beinhalten, müssen bei der Immunaффinitätschromatographie unbedingt eingebaut sein. Die HIC benötigt keine
35 chromatographischen Vorreinigungsschritte und dann zusätzlich noch sehr leicht mit Natronlauge entpyrogenisiert werden. Durch die Natronlaugenbehandlung der HIC werden auch unspezifisch gebundene Proteine und nicht proteinogene Substanzen entfernt.

2.1. Beschreibung der Vorreinigungsschritte

Je nach Ausgangsmaterial (Bakterien, Hefen, Erythrozyten
5 oder tierischen Zellen) müssen verschiedene Extraktions-
schritte bzw. Vorreinigungsschritte dem eigentlichen
Reinigungsverfahren vorgeschaltet werden.

Das Aussalzen, insbesondere die Ammonsulfatfällung ist
ein effektiver Vorreinigungsschritt für die rh-SOD
10 Bakterien oder Hefen als Ausgangsmaterial.

Die Mikroorganismenbrühe wird homogenisiert. Es eignen
dazu sowohl enzymatische Methoden (Lysozym) als auch
mechanische, (Hochdruckhomogenisatoren) oder physikalische
(Ultraschall) Methoden. Um die Zentrifugierbarkeit des
15 viskosen Homogenates zu verbessern, können dem
Extraktionspuffer Nukleasen zugesetzt werden. Dadurch wird
die DNA in kleinere Bruchstücke verdaut und somit sinkt
die Viskosität. Das Homogenisat wird mit Hilfe von
Zentrifugation oder Mikrofiltration geklärt.

20 Das geklärte Homogenat wird mit Ammonsulfat oder
einem entsprechenden Salz versetzt, sodaß eine Endkonzen-
tration zwischen 40 und 60 % erhalten wird. Die Cu/Zn-SOD
bleibt im Überstand, das Präzipitat wird neuerlich durch
Zentrifugation oder Mikrofiltration abgetrennt.

25

2.2. Hydrophobic Interaction Chromatographie

Die Hydrophobic Interaction Chromatographie wurde von
30 W. Melander (7) und Ochoa (8) in Reviews beschrieben. Diese
Art der Chromatographie basiert auf der spezifischen
Wechselwirkung der hydrophoben Zentren in den Proteinen
mit einem hydrophoben Liganden, (wie Phenyl, Octyl,
Butylliganden usw.) in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen.
35 Diese hohen Salzkonzentrationen bewirken durch Wasser-
entzug und Abblocken hydrophiler Zentren im Protein die
spezifische Wechselwirkung.

ERSATZBLATT

Die Hydrophobic Interaction Chromatographie (HIC) über Phenyl, Butyl, Octylsäulen etc. ist nur sinnvoll in Kombination mit einer Salzfällung einzusetzen. Der geklärte Überstand aus der Ammonsulfatfällung bzw. Salzfällung wird
5 auf die HIC-Säule aufgetragen, die vorher mit einer entsprechenden Salzlösung äquilibriert wurde. Die SOD wird mit Salzpuffer niedriger Salzkonzentration eluiert.

Aufgrund der hohen Salzlöslichkeit der SOD ist die Hydrophobic Interactionchromatographie besonders gut für
10 das gegenständliche Reinigungsproblem geeignet. Durch die hohe Ammonsulfatkonzentration können Verunreinigungen in diesem Vorreinigungsschritt entfernt werden.

15 2.3. Nachweis der Cu/Zn-SOD

Die SOD-Bestimmung wurde entweder immunologisch chromatographisch oder mit einem Aktivitätstest durchgeführt.

20 Immunologischer SOD-Nachweis mit ELISA:

Es wurde Prozedur nach T.Porstmann (6) verwendet. Der Test basiert auf Verwendung zweier SOD-spezifischer monoklonaler Antikörper. Einer davon ist mit Meerrettichperoxidase gekoppelt. Die Auswertung erfolgte in
25 einem Mehrkanalphotometer für Mikrotiterplatten (Easy Reader der Firma SLT).

Aktivitätstest:

Es wurde ein Testsystem gewählt, mit dem Xanthin/Xanthin
30 oxidase als Radikalgenerator und Nitrobluetetradolium als Indikatorradikalfänger verwendet wird.

Auch dieser Test wurde in Mikrotiterplatten durchgeführt. 100 µl Reagenzlösung und 50 µl Probe bzw. Blindwert werden zusammenpipettiert und photometrisch bei 600 nm
35 ausgewertet. Danach werden 50 µl Xanthinoxidase zupipettiert und 20 min. unter leichtem Schütteln inkubiert und wieder photometrisch bei 600 nm ausgewertet. Das farblose Nitrotetrazolium blau (NBT) wird die durch O₂-Radikale,

ERSATZBLATT

die durch Xanthinoxidase entstehen zu einer blauen Farbe aufoxidiert. In Gegenwart von SOD bleibt die Lösung ungefärbt. Als SOD-Standard wurde Peroxinorm der Fa. Grünenthal verwendet.

5

Puffer für den Aktivitätstest

- Reagenzlösung I besteht aus

50 mMolar Kaliumphosphatpuffer, 1,25 m Molar

10 Diethylentriaminopentaessigsäure Puffer 100 μ l

Puffer werden mit 10 mg Xanthin, 15 mg NBT und ca. 4000 Einheiten Katalase versetzt

15 - Xanthinoxidase wird so in einem 50 mM Kaliumphosphat, 1,25 mM Diethylentriaminopentaessigsäure Puffer gelöst, daß 100 ml eine Einheit des Enzyms enthalten

Definition der Einheiten:

20

Katalase: 1 Einheit baut 1,0 μ M H_2O_2 pro Minute bei pH 7,0 und 25 °C ab, wobei die H_2O_2 Konzentration von 10,3 auf 9,3 μ M/ml fällt

Xanthinoxidase: 1 Einheit konvertiert 1,0 μ M Xanthin zu Harnsäure pro Minute bei pH 7,5 und 25 °C.

25

Chromatographische Bestimmung

30

Die SOD wurde auch mit Reversed Phase Chromatographie (RPC) quantifiziert. Es wurde eine C-4 oder C-14 Säule eingesetzt. Mit einem Acetonitrilgradienten (20-60 %) mit 0,1 % TFA wurde eluiert. Als Detektor wurde ein 35 Diodenarray detector der Fa. Hewlett Packard verwendet. Die Methode eignet sich auch zur Quantifizierung von SOD aus Rohextrakten.

ERSATZBLATT

3. BEISPIELE

Beispiel I

5 Rekombinanter Mikroorganismenstamm

- Ein für humane Cu/ZnSOD kodierendes chemisch synthetisiertes Gen wurde über entsprechende flankierende Sequenzen in die Restriktionsschnittstellen BamH1 und HindIII des Plasmids pEMBL 8 kloniert. Aus dem so amplifizierten Plasmid pEMBL 8-SOD wurde das SOD-Gen mit den Restriktionsenzym ECOR1 und HindIII herausgeschnitten und das gereinigte Restriktionsfragment in den Vektor pKK 223-3 (Pharmacia) kloniert.
- 15 Die AUG flankierenden Regionen des SOD-Gens wurden mittels der in vitro Mutagenese mit einem Oligonucleotid von der Sequenz:

5'-CACACAGGAAACAGACATATGGCAACAAAGGCCGTGTGCGTGC-3'

20

- so verändert, daß eine hohe Expression von humaner Cu/ZnSOD ermöglicht wurde. (Hallewell et. al.; 1) Das so erhaltene Plasmid pKK223-SOD X 16 wurde in E.Coli JM 105 (Pharmacia) Wirtszellen transformiert und die rekombinanten E.Coli Zellen im Batchverfahren kultiviert. 2 Stunden nach Induktion mit Isopropylthiogalactosid (IPTG) wurde die Biomasse geerntet.

30 Zellernte und Aufschluß

- Nach der Induktion mit IPTG wurde die Biomasse durch Zentrifugation abgetrennt. Das Pellet wird im Extraktionspuffer gewaschen und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Der Aufschluß wurde enzymatisch mit Lysozym durchgeführt.
- 35

ERSATZBLATT

(Lysozym wurde bei 37 °C mit dem gewaschenen resuspendierten Pellet inkubiert). Um die Viskosität zu erniedrigen wurde das Homogenisat mit DNase inkubiert. Das geklärte Homogenat wurde so bei 4 °C mit gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt, daß eine 60 % Endkonzentration erreicht wurde. Das Präzipitat wird durch Zentrifugation abgetrennt und der Überstand wird weiterverarbeitet. Anstelle von gesättigter Ammonsulfatlösung kann festes Ammonsulfat direkt in das Homogenat eingerührt werden.

4.3. Hydrophobic Interaction Chromatographie (HIC)

Durch diesen Schritt können hydrophobe und hydrophile Substanzen getrennt werden. Die rh-SOD bindet an die Säule bei hoher Ionenstärke und kann bei geringer Ionenstärke eluiert werden.

AUFSCHLUSS

Da sich die rh-SOD in der E.Coli Zelle befindet, muß die Zelle aufgeschlossen werden. Hier wird eine enzymatische Methode mit Lysozym aus Hühnereiweiß angewendet.

Folgende Materialien und Chemikalien wurden verwendet:

- TRIS-Base (Fa. Sigma)
- CuSO_4
(Dinatrium EDTA; (Fa. Merck)
- ZnCl_2 (Fa. Merck)
- konz. Mercaptoethanol (Fa. Sigma)
- PMSF gelöst in Äthanol (Fa. Sigma)
- Lysozym (Fa. Sigma, oder Fa. Serva)
- Triton x-100 (Fa. Serva)
- DNASE I (Fa. Sigma)

ERSATZBLATT

Zusammensetzung der Lösungen

5	- Waschpuffer für E.Coli Zellen		
	100 mM Tris/HCL pH 8,0 versetzt mit 100 mM NaCl und 1 mM EDTA		
10	- Resuspensionspuffer:		
	20 mM TRIS/HCL pH 8,2		
	- Aufschlußstammlösung:		
15	Volumen		
	für 30 ml E.coli	Stammlösung	Endkonzentr. in E.coli susp.
20	300 µl	500 mM EDTA	5 mM
	150 µl	200 mM CuSO ₄	1 mM
	30 µl	100 mM ZnCl ₂	100 mM
	15 µl	Mercatoethanol	7 mM
	600 µl	5 % PMSF gelöst in Äthanol	0,1 %
30	600 µl	10 mg/ml Lysozym	0,2 mg/ml
	30 µl	10 mg/ml DNase I	15 units/ml

Zu 30 ml der Bakteriensuspension kommen die angegebenen
 25 Volumen der Stammlösung. Danach wird 5 min bei 40 °C
 inkubiert. Die Lyse der Zellen erfolgt durch Zugabe von
 1,5 ml 10 %iger Triton x-100 Lösung und 5 minütiger
 Inkubation bei 40 °C. Die lysierten Zellen werden mittels
 Zentrifugation abgetrennt und der klare Überstand
 30 weiterverwendet.

Folgende Materialien und Chemikalien wurden verwendet:

- 35 - Phenylsepharose fast flow (Fa. Pharmacia)
 - Ammonsulfat tech. rein
 - TRIS-Base (Fa. Sigma)
 - HCl 25 %

ERSATZBLATT

Die Pufferbereitung erfolgte nach folgender Vorschrift:

- Äquilibrierungspuffer:
60 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in 25 mM TRIS HCl pH 7,5
5 3,0 g TRIS/1000 ml + 351 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ mit HCl auf pH
stellen
Leitfähigkeit 200 mS/cm
- Elutionspuffer II:
25 mM TRIS/HCl pH 7,5 wird
10 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gelöst 25 mM TRIS (auf 160 S/cm
Leitfähigkeititriert, Zimmertemperatur
- Regenerierungspuffer:
25 mM TRIS/HCl pH 7,5
Leitfähigkeit: 1,9 mS/cm

15

Die Chromatographie wurde wie folgt durchgeführt:

- Packen der Säule mit 20 % Äthanol
- 20 - Äquilibrieren der Säule

Säule wird mit Äquilibrierungspuffer äquilibriert. Aufgrund
der hohen Viskosität der Lösungen ist es von Vorteil
diesen und alle anderen Lösungen von unten nach oben
25 durch die Säule zu pumpen. Dadurch kann die störende
Kanalbildung verhindert werden.

- Auftragen
Mikrofiltrat der Probe wird aufgetragen
- 30 - Auswaschen
Nach dem Auftragen wird mit Äquilibrierungspuffer bis
zum Erreichen der Basislinie ausgewaschen
- Elution
Mit den verschiedenen Elutionspuffern werden die
35 Fraktionen eluiert und peakweise gesammelt.
- Die SOD wird bei ca. 170 mS/cm eluiert.
- Mit Reinigungspuffer werden die noch an der Säule
haften den Proteine eluiert.
- Nach Äquilibrieren kann die gleiche Säule mehrmals
40 wieder verwendet werden.

ERSATZBLATT

50 ml Phenyl-Sepharose fast flow der Fa. Pharmacia wurde in eine Säule mit 5 cm₂ Querschnitt gepackt. Das Gel wurde mit einer 60 %igen Ammonsulfatlösung äquibriert. Der
5 geklärte Überstand aus der Ammonsulfatlösung wurde mit 0,2 um Filter von allen Feinteilen befreit und auf die Phenyl-Sepharose fast flow aufgetragen.

Die Elution erfolgte mit einer Ammonsulfatlösung etwas geringerer Konzentration (ca. 50 % Sättigung) als der des
10 Äquibrierungspuffer.

Die einzelnen Fraktionen wurden zusätzlich mit reversed Phase chromatographie (RPC) über RRC C14 überprüft. Die Elution erfolgte mit einer Ammonsulfatlösung etwas geringerer Konzentration (ca. 50 % Sättigung) als der des
15 Äquibrierungs-puffer.

Die Reinigungsergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Die SOD-Konzentration wurde mittels ELISA wie von Porstmann et.al. beschrieben, bestimmt.

Die einzelnen Fraktionen wurden zusätzlich mit Reversed
20 Phase Chromatographie (RPC) überprüft.

Tabelle 1: Zusammenfassung der Reinigungsergebnisse, Ammonsulfatberstand aus geklärten E.Coli Homogenat wird mit Phenylsepharose fast flow aufgetrennt.
* n.d.= nicht detektierbar mit spezifischer E.Coli DNA Probe

5

Stufe	Aktivität	SOD (mg)	Protein (mg)	Ausbeute (%)	Endotoxin (ng/ml)	DNA
- E.coli Homogenat	n.d.	39,1	800	100	150.000	

10

ERSATZBLATT

15

-Überstand						
Ammonsulfatfällung	16,7	17,2	198	42,7	150	
- Eluat der Phenyl Superose fast flow	13,7	12,8	34,7	32,7	1 ng.	n.d.

20

Der in Fig. 1 mit SOD gekennzeichnete Peak wurde mit RPC auf seine Reinheit geprüft und im Vergleich dazu auch der Ammon- sulfatüberstand. Die Proben wurde vor Injektion
5 in die RPC-Säule mit Sephadex G25 Säulen entsalzt. Daraus resultiert eine unterschiedliche Verdünnung der Proben. Das Ausgangsmaterial ist doppelt so stark verdünnt als das Eluat. Die Retentionszeit der SOD wurde mit einem Material der Firma Biotechnology General
10 (Israel) bestimmt. Die RPC-Chromatogramme der ungereinigten und der gereinigten SOD sind in Fig. 2 und 3 zusammengefaßt. Die entsprechenden Elektropherogramme (Es wurde das Phastsystem der Fa. Pharmacia verwendet. Die Auftrennung wurde laut Anleitung des Herstellers
15 durchgeführt.) sind aus Fig. 3 ersichtlich (Bahn 1 der Molekulargewichtsmarker, 2 Cu/Zn-SOD nach Hartmann et.al., 3 der Ammonsulfatüberstnad, 4 HIC Peak gekennzeichnet mit SOD, 5 HIC gekennzeichnet mit Peak 2, 6 die mit Cu Chelatchromatographie gereinigte SOD.), wobei
20 ein homogenes Produkt erhalten werden konnte.

4.4. Metallchelatchromatographie

25 Das Eluat wurde mittel Cu-Chelat-Chromatographie nach Weselake et.al. (13) weitergereinigt. Das erhaltene Protein wurde auch elektrophoretisch charakterisiert (Fig. 3). Es ist absolut pyrogenfrei.

30

BEISPIEL II.

1. Rekombinanter Mikroorganismenstamm

35 Es wurde das in E.Coli eingesetzte Gen für die Verwendung in Hefen umkonstruiert und in Hefestämmen der Gattung Saccharomyces und Pichia eingesetzt.

ERSATZBLATT

2. Zellernte und Aufschluß

5

Nach Erreichen der stationären Phase wurde die Biomasse durch Zentrifugation abgetrennt. Das Pellet wird im Extraktionspuffer gewaschen und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die Zellen wurden
10 mit einer Schwingmühle der Fa. Netzsch aufgeschossen. Das geklärte Homogenat wurde bei 40°C mit gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt. (60 % Endkonzentration). Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation abgetrennt und der Überstand wird weiterverarbeitet.

15

3. Hydrophobic Interaction Chromatographie HIC

Octylsepharose CL-4 B (ca. 50 ml) der Fa. Pharmacia wurde
20 in eine Säule mit 5 cm^2 Querschnitt gepackt. Das Gel wurde mit 60 % Ammonsulfat äquilibriert. Der Ammonsulfat-Überstand wurde auf die Octylsepharose aufgetragen. Die Elution erfolgte mit 50 % Ethylenglycol. Die Reinigungsergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. Es
25 konnte ein enzymatisch aktives und immunologisch Enzym gefunden werden, weil der Quotient aus Aktivitätstest und ELISA im Bereich von 1 (Tabelle 2) liegt.

Der Erfolg des Chromatographie-Schrittes ist aus Fig. 4 ersichtlich. Das Ausgangsmaterial und das Eluat aus der
30 HIC wurden durch RPC auf einer C-4 Säule charakterisiert. Da bei 214 nm auch nicht proteingene Verunreinigungen erfaßt werden, zeigt die RPC die spezifische Anreicherung der SOD bezogen auf alle vorhandenen Verunreinigungen, liegt bei weitem höher als die spezifische Anreicherung
35 bezogen auf Protein.

5 Tabelle 2: Zusammenfassung der Reinigungsergebnisse von rh-SOD aus Saccharomyces cerevisiae. Der Ammonsulfatberstand aus dem geklärten Hefehomogenat wird mit Oxytalsepharose CL-4B weiter aufgetrennt. Die Ausbeute wurde basierend auf den Aktivitätstest kalkuliert.

Stufe	Volumen (ml)	SOD (mg)	Protein spez.		Ausbeute (%)
			Aktivität	mg	
			ELISA	Anreich.	
10					
15					
- berstand					
Ammonsulfatfllung	500	46,0	45,0	254	100
20 - Eluat	84	32,6	34,0	38,0	70,8

ERSATZBLATT

BEISPIEL III

5

Reinigung von Cu/Zn-SOD aus humanen Erythrozyten

Die gefrorenen Erykonzentratbeutel wurden einem Gefriertauzyklus unterworfen und in gefrorenem Zustand in
10 einem Kesselgepoolt und aufgetaut. Die aufgetauten Erythrozyten wurden ca. 1 h lang gerührt. 30 kg Erythrozytenkonzentrat wurden mit 70 kg, 80 °C heißem pyrogenfreien Wasser versetzt und auf 70 °C erhitzt. Die Suspension wurde eine Stunde lang heißgehalten, gerührt und
15 danach innerhalb von 10 min. auf Zimmertemperatur abgekühlt. Das Präzipitat wurde bei 15000 g in einer Röhrenzentrifuge (Padberg, BRD) abgetrennt, und das Zentrifugat wurde direkt der Ammonsulfatfällung unterworfen (60 % Endkonzentration).

20 Das Präzipitat wurde neuerlich bei 15000 g abzentrifugiert und über ein 0,45 µm Filter filtriert. Für die Hydrophobic Interactionchromatographie wurde Phenylsepharose fast flow verwendet. Die Säule wurde mit einem 10 mM Kaliumphosphatpuffer, der mit 2,4 Mol Ammonsulfat pro Liter
25 versetzt wurde (entspricht ca. 60 % Sättigung), äquilibriert. Das filtrierte Zentrifugat wurde auf die äquilibrierte Phenylsepharose fast flow (100 ml) aufgetragen, der nicht gebundene Anteil wurde mit Äquilibriumspuffer ausgewaschen. Die Cu/Zn-SOD wurde mit
30 einem 10 mM Kaliumphosphatpuffer der mit 1,6 Mol Ammonsulfat pro Liter versetzt wurde, eluiert. Die Fraktionen die Cu/Zn-SOD enthalten, wurden gepoolt und die SOD-Aktivität und der Proteingehalt wurden anschließend bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.

35 Das Ausgangsmaterial und das Eluat von der HIC wurde einer RPC unterworfen. Die Chromatogramme sind in Fig. 5 zusammengefaßt. Auch hier ist eine starke spezifische Anreicherung zu beobachten.

ERSATZBLATT

5

Tabelle 3: Zusammenfassung der Reinigungsergebnisse, Reinigung der Cu/Zn-SOD mit Phenylsepharose fast flow nach Hitze und Ammonsulfatfällung

10 Stufe	Volumen (ml)	SOD (mg)	Protein (mg)	Anreicherung (mg)	Ausbeute (%)
- berstand					
15 Ammonsulfatfällung	1000	17,0	1200	1	100
- Eluat	120	14,3	24	42,5	67,2

ERSATZBLATT

BEISPIEL IV

Reinigung von rh-SOD aus Zellkulturüberstand

- 5 Ein ähnlicher Expressionsvektor wie er von Tibel et.al. für die Expression von extrazellulärer SOD verwendet wurde, kam auch hier zum Einsatz.

10 Konstruktion des Expressionsvektors

Es wurde ein SV-40 Expressionsvektor, der folgende relevante DNA-Sequenzen enthält, konstruiert:

- 15 SV-40 Sequenz Basenpaar bp 5173 HIND III bis bp 294 (Kpn I), das den Early promotor und den Origin of replication enthält. Weiters wurden die SV-40 Sequenzen bp 2770 (Bcl I) bis bp 2533 (Bam HI) die das Polyadenylierungssignal enthalten kloniert. Weiters wurde ein synthetische
- 20 Polylinker für verschiedene Restriktionsenzyme einschließlich Eco RI, und pBR 322 Sequenzen, die das β -Lactamase Gen und den Origin of Replication enthalten, verwendet.

Die gereinigten DNA-Fragmente wurden in einer

25 Mehrstufenprozedur mit Hilfe verschiedener Vektoren zusammengesetzt. Das entsprechende cDNA-Fragment, das die Cu/Zn-SOD kodiert wurde in die entsprechende Schnittstelle des Polylinkers eingesetzt.

30

Expression von Cu/Zn-SOD in CHO-Zellen

- Das so konstruierte Plasmid wurde linearisiert und mit pSV 2 NeoDNA in CHO-K1 Zellen kotransfiziert. Die Gentamicin-
- 35 418 (G-418) resistenten Klone wurden in Optimem Medium, das mit 5 % fötalem Kälberserum und G-418 versetzt gezüchtet. Der Überstand wurde zur Isolierung und Reinigung von Cu/Zn-SOD herangezogen.

ERSATZBLATT

Reinigung der SOD

5

Der Kulturüberstand wurde mit Hilfe von 0,2 μ m Filter von Feinteilen befreit und mit festem Ammonsulfat versetzt, daß eine 60 % Endkonzentration erreicht wurde.

Der durch Zentrifugation geklärte Überstand wurde auf eine
 10 mit 60 % Ammonsulfat äquilibrierte Phenylsuperose aufgetragen. Die Elution der SOD erfolgte mit etwas geringerer Ammonsulfatkonzentration. Die gesammelten Fraktionen wurden mit Aktivitätstest ELISA und RPC auf SOD-Gehalt und
 15 Reinheit geprüft. Die Reinigungsergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengefaßt. Die Chromatogramme der RPC sind in Fig. 5 zusammengefaßt.

Tabelle 4: Reinigungsergebnisse der rh-SOD aus CHO-Zell-
 20 kulturüberstand. Die SOD wurde mit Phenylsepharose aufgetrennt.

		rh-SOD				
		Volumen	Protein	Aktivität	ELISA	Ausbeute
25		(ml)	(mg)	(mg)	(mg)	(%)
	Ammonsulfat	50	40	0,15	0,16	100
	Überstand					
30	Eluat	4	9	0,12	0,11	80
	Phenylsuperose					

35 Eine weitgehende Anreicherung bezogen auf Protein und Volumen konnte durch die HIC erzielt werden.

ERSATZBLATT

- 1) R. Hallewell; F. Masiarz, R. Najarian, J. Puma,
5 M. Quiropa, A. Quiropa, A. Randolph, R. Sanchez Pescador,
C. Scandella, B. Smith, K. Steiner and T. Mullenbach
Human Cu/Zn superoxide dismutase cDNA; isolation of
clones synthesising high levels of active or inactive
enzymes from an expression library.
10 Nucleic Acid Research 13, 2017, 1985.
- 2) J. Hartmann, T. Geller, Z. Youin, D. Bartfield,
D. Kanner, H. Aviv and M. Gorecki
Highlevel expression of enzymatically active human Cu/Zn
15 superoxide dismutase in Escherichia coli
Proc. Natl. Acad. Sci. 83, 7142, 1986
- 3) L. Tibell, K. Hjalmarsson, T. Edlund, G. Skogman,
A. Engström and S. Marklund
20 Expression of human extracellular superoxid dismutase
in Chinese hamster ovary cells and charakterization of
the product
Proc. Natl. Acad. Sci. 84, 6634, 1987
- 25 4) R. Hallewell, R. Mills, P. Tekamp-Olson, R. Blacker,
S. Rosenberg, F. Ötting, F. Masiarz and C. Scandella
Amino terminal acetylation of authentic human Cu/Zn
superoxide dismutase produced in yeast
Biotechnology 5, 363, 1987
30
- 5) M. Takahara, Sagai, S. Inoye and M. Iouye
Secretion of human superoxide dismutase in
Escherichia
35 Coli. Biotechnology 6, 195, 1988.

- 6) T. Porstmann, R. Wietschke, H. Schmechta, R. Grunow,
B. Porstmann, R. Bleiber, M. Pergande, S. Stachat and R.
5 von Baehr
Rapid and sensitive enzyme immuno assay for
Cu/Zn superoxide dismutase with polyclonal and
monoclonal antibodies
Clinica Chimica Acta 171, 1-10; 1988
- 10 7) W. Melander and C. Harvath
Salt Effects on hydrophobic Inteactions in
Precipitation and Chromatography of Proteins: An
Interpretation of the Lyotropic Series.
15 Archives of Biochemistry and Biophysics 183,200-1977
- 8) J.L. Ochoa
Hydrophobic (Interaction) chromatography
Biochemie, 60;1; 1978
- 20 9) K. Menander-Huber in
Biological and clinical aspects of superoxide and super-
oxide dismutase ed W. Bannister and J. Bannister
p. 408-423, Elsevier/North, 1980
- 25 10) U. Fincke, J. Schneider, E. Friderichs, H. Giertzard
and L. Flohe
Enhanced Myocardial Salvage by combined treatment
with recombinant human superoxide dismutase in a
30 canine coronary thrombosis model.
Arzneimittelforschung 38, 138, 1988
- 11) L. M. Olson, G. Klintmalm, B. Husberg, J. Nery,
C. Whitten, A. Paulsen and R. McClure
35 Superoxide Dismutase improves organ preservation in
liver Transplantation
Proceedings 20, 961-964, 1988

ERSATZBLATT

- 12) C. Billiaderis, R. Weselake, A. Pethou and A. Friesens
A colorimetric study of human Cu/Zn superoxide
dismutase
Biochem.J. 248, 981-984, 1987
- 5
- 13) R. Weselake, S. Chesney, A. Pethou and A. Friesen
Purification of human Copper, Zinc Superoxide
Dismutase by Copper Chelate Chromatography
Anal.Biochem. 155, 193-197, 1986
- 10
- 14) M. Miyota-Asano, K. Ito, H. Ikeda and S. Sekigucki
Purification of copper-zinc-superoxide dismutase
and catalase from human erythrocytes by copper-
chelate affinity chromatography
15 J.Chromat. 370, 501-507, 1986
- 15) K. Arai, S. Izuka, A. Makita, K. Oikana and N.
Tanigucki
Purification of Cu/Zn superoxide dismutase from
20 human erythrocytes by immuno affinity chromatography.
J.Immunol.Meth. 91, 139-143, 1986

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Isolierung und Reinigung von Cu/Zn-Superoxiddismutase (Cu/Zn-SOD), dadurch gekennzeichnet,
5 daß, gegebenenfalls nach entsprechender Vorreinigung, die Cu/Zn-SOD durch Hydrophobic Interaction Chromatographie (HIC) von Fremdproteinen getrennt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
10 daß die durch HIC von Fremdproteinen getrennte Cu/Zn-SOD mittels Metallchelatchromatographie oder Ionentauscherchromatographie nachgereinigt wird.
3. Verfahren nach Anspruch oder dadurch gekennzeichnet,
15 daß die Vorreinigung durch Fällung mittels Ammonsulfat oder einem äquivalenten Fällungssalz durchgeführt wird.
4. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet,
20 daß die HIC-Säule mit 40 - 60 %iger Ammonsulfatlösung äquilibriert wird und die Elution mittels eines Stufengradienten mit niedrigerer Ammonsulfatkonzentration durchgeführt wird.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
25 dadurch gekennzeichnet, daß rekombinante SOD aus E. coli als Ausgangsmaterial verwendet wird.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet, daß rekombinante SOD aus Hefe
30 als Ausgangsmaterial verwendet wird.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet, daß SOD aus Erythrozytenzellen als Ausgangsmaterial verwendet wird.
35
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß als Ausgangsmaterial durch transgene Tiere produzierte SOD verwendet wird.

ERSATZBLATT

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß native SOD aus Säugetierblut oder Säugetierzellen als Ausgangsmaterial eingesetzt wird.
- 5
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß rekombinante SOD aus Säugetierzellen als Ausgangsmaterial verwendet wird.
- 10 11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß rekombinante SOD aus Insektenzellen als Ausgangsmaterial verwendet wird.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 und 4 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß für die HIC Phenylsepharose fast flow oder Phenylsepharose 4 B verwendet wird.
- 15
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 und 4 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß für die HIC Phenylsuperose oder Alkylsuperose verwendet wird.
- 20
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 und 4 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die HIC ein Ligand, ausgewählt aus der Gruppe isopropyl, tertiär butyl, sec butyl, sec pentyl, isopentyl, cyclohexyl, Phenyl, Octyl, gebunden an einen Träger, ausgewählt der der Gruppe quervernetzte Agarose, Cellulose, Sepharose, Silica, Polyacrylamide, verwendet wird.
- 25

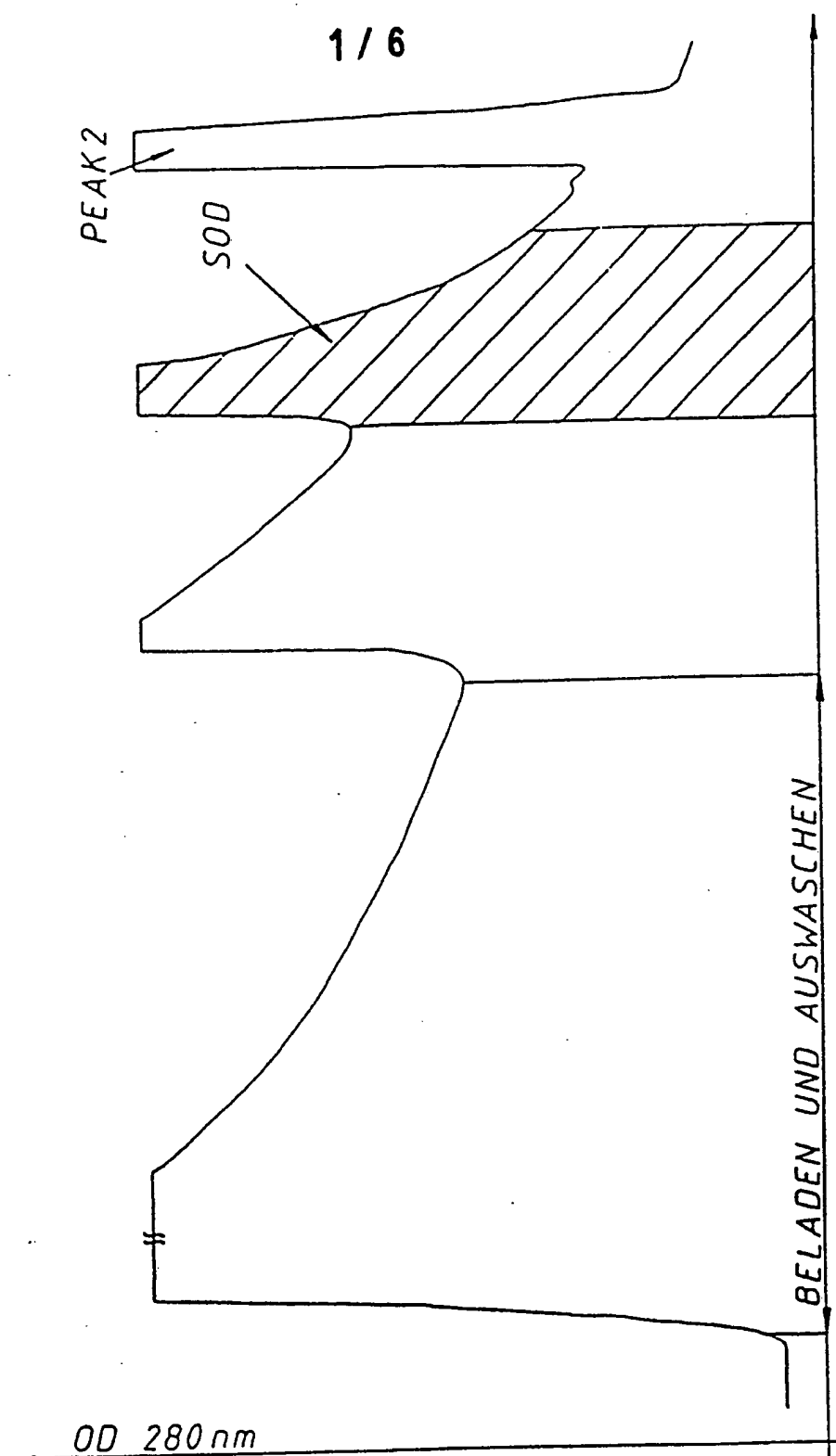
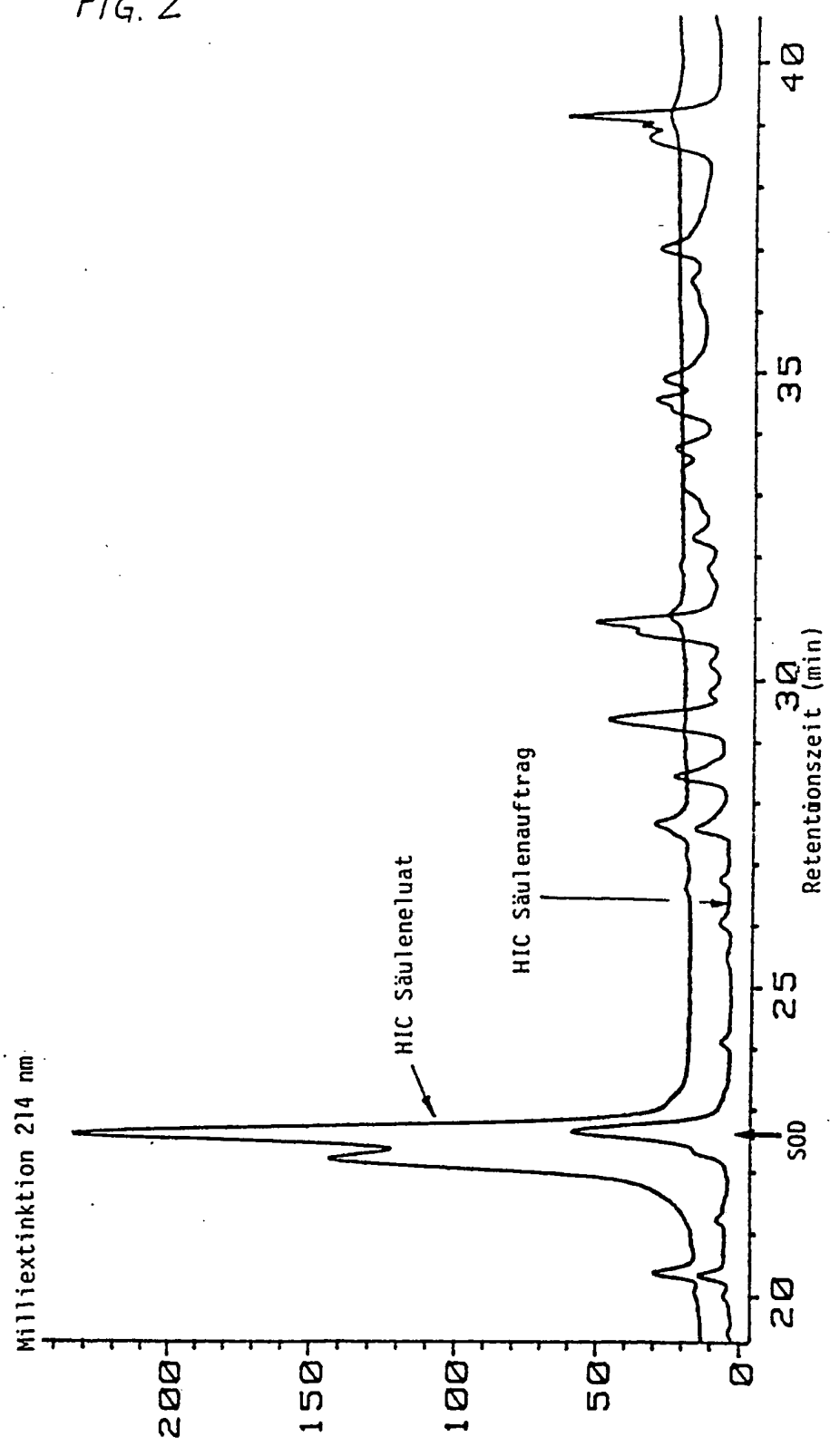


Fig. 1

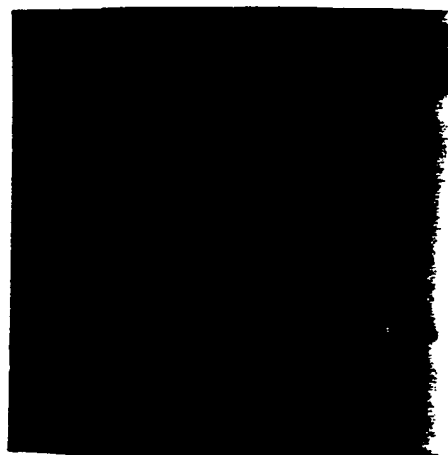
2 / 6

Fig. 2



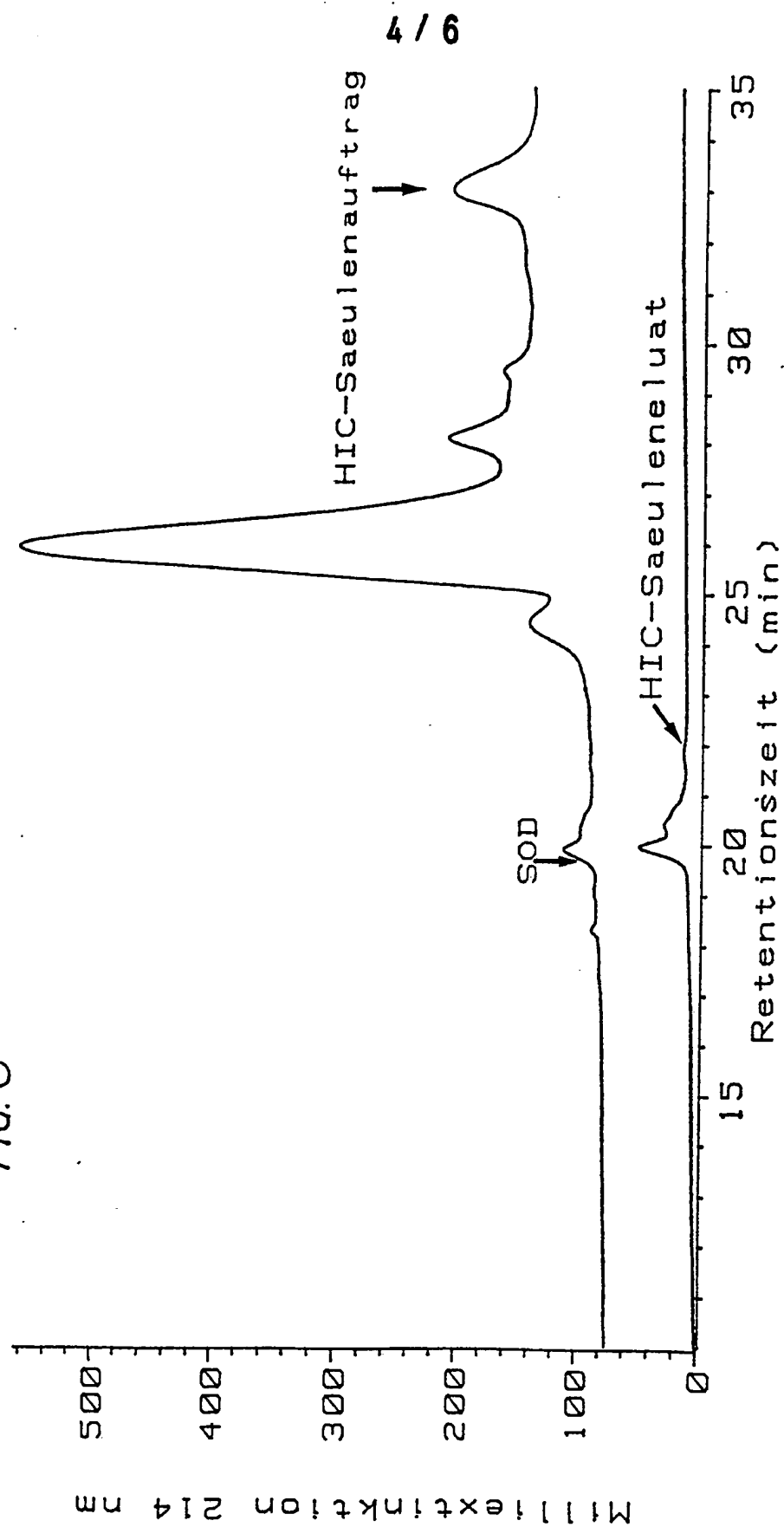
3 / 6

FIG. 3



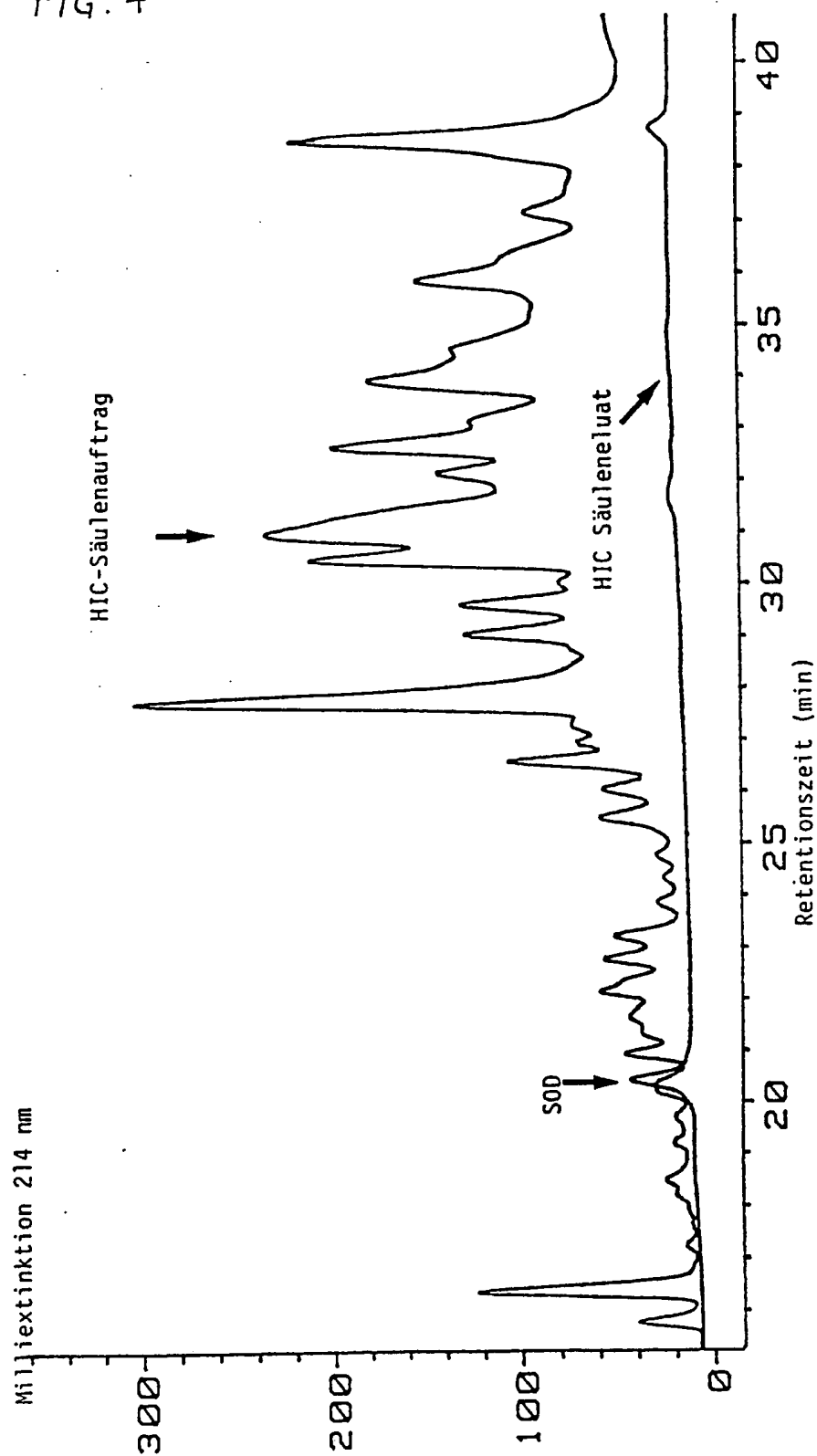
1 2 3 4 5 6

Fig. 6

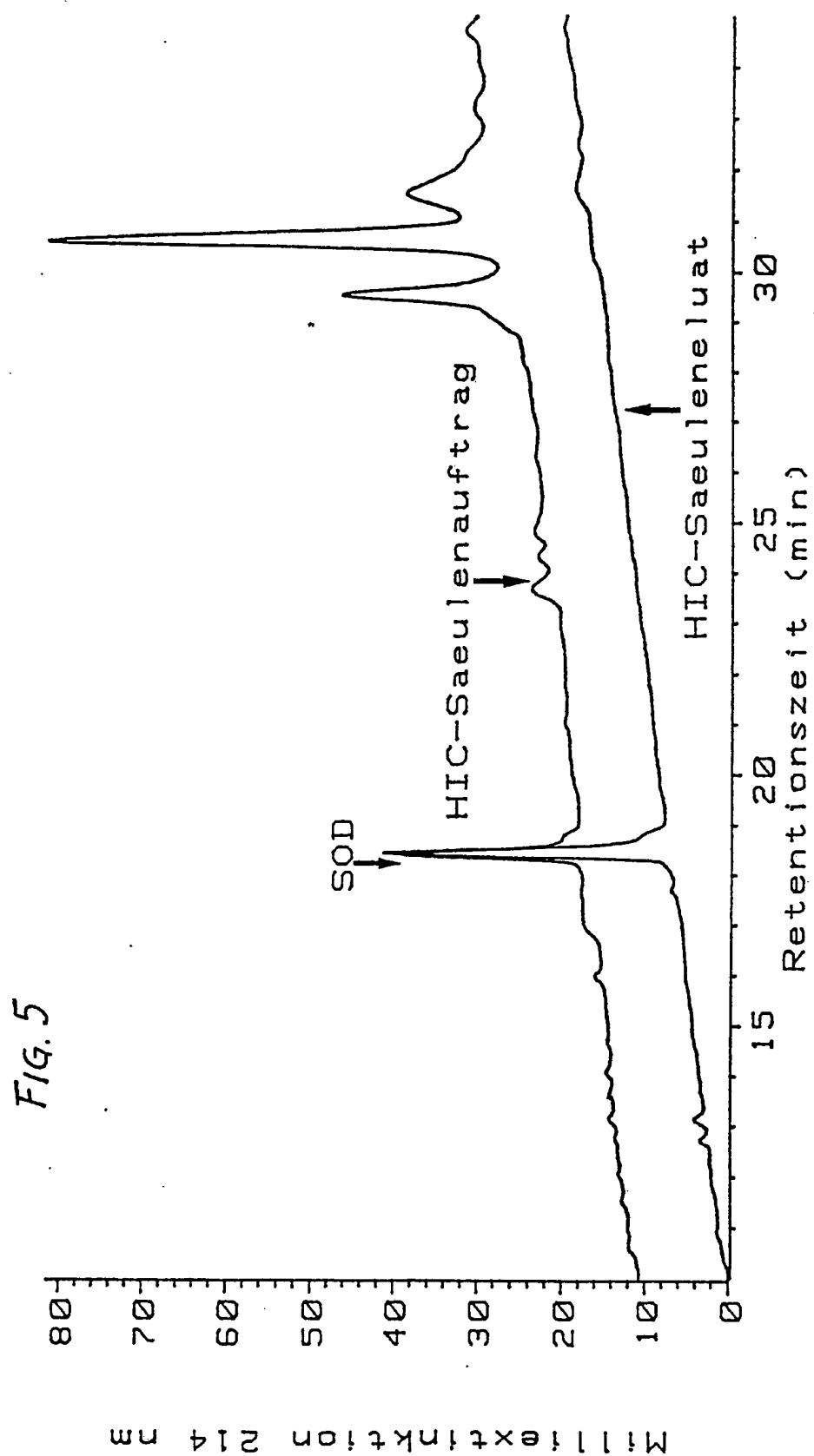


5 / 6

Fig. 4



6 / 6



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/AT89/00099

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) ⁶ According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC Int.Cl.5 C12N 9/02																							
II. FIELDS SEARCHED <div style="text-align: center; border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black;">Minimum Documentation Searched ⁷</div> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 25%; border-bottom: 1px solid black;">Classification System ¹</td> <td style="border-bottom: 1px solid black;">Classification Symbols</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">Int.Cl.5</td> <td style="padding: 5px;">C12N</td> </tr> </table> <div style="text-align: center; border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black;">Documentation Searched other than Minimum Documentation to the extent that such documents are included in the fields searched ⁸</div>			Classification System ¹	Classification Symbols	Int.Cl.5	C12N																	
Classification System ¹	Classification Symbols																						
Int.Cl.5	C12N																						
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹ <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%; padding: 5px;">Category ⁹</th> <th style="width: 60%; padding: 5px;">Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²</th> <th style="width: 30%; padding: 5px;">Relevant to Claim No. ¹³</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">X</td> <td style="padding: 5px;">DD, A1, 252615 (KARL-MARX-UNIVERSITÄT) 23 December 1987, see the whole document</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">Y</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">---</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1-14</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">Y</td> <td style="padding: 5px;">BIOCHIMIE, Vol 60, 1978 J.L. Ochoa: "HYDROPHOBIE (INTERACTION) CHROMATOGRAPHY" see page 1- page 15 ---</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1-4</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">A</td> <td style="padding: 5px;">EP, A, 0019474 (DE FORENEDE BRYGGERIER A/S) 26 November 1980; see the whole document ---</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">6</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">A</td> <td style="padding: 5px;">EP, A, 0038393 (DE FORENEDE BRYGGERIER A/S) 28 October 1981 see the whole document ---</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">7,9</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">P,X</td> <td style="padding: 5px;">Dialog Information Services, File 351 World Patent Index 81-89, Dialog accession no. 89-319092/44, UBE Industries KK et al: "Prodn. of copper- zinc type superoxidedismutase and catalase-by treating heamolysate by</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1-4,7,9</td> </tr> </tbody> </table>			Category ⁹	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³	X	DD, A1, 252615 (KARL-MARX-UNIVERSITÄT) 23 December 1987, see the whole document	1	Y	---	1-14	Y	BIOCHIMIE, Vol 60, 1978 J.L. Ochoa: "HYDROPHOBIE (INTERACTION) CHROMATOGRAPHY" see page 1- page 15 ---	1-4	A	EP, A, 0019474 (DE FORENEDE BRYGGERIER A/S) 26 November 1980; see the whole document ---	6	A	EP, A, 0038393 (DE FORENEDE BRYGGERIER A/S) 28 October 1981 see the whole document ---	7,9	P,X	Dialog Information Services, File 351 World Patent Index 81-89, Dialog accession no. 89-319092/44, UBE Industries KK et al: "Prodn. of copper- zinc type superoxidedismutase and catalase-by treating heamolysate by	1-4,7,9
Category ⁹	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³																					
X	DD, A1, 252615 (KARL-MARX-UNIVERSITÄT) 23 December 1987, see the whole document	1																					
Y	---	1-14																					
Y	BIOCHIMIE, Vol 60, 1978 J.L. Ochoa: "HYDROPHOBIE (INTERACTION) CHROMATOGRAPHY" see page 1- page 15 ---	1-4																					
A	EP, A, 0019474 (DE FORENEDE BRYGGERIER A/S) 26 November 1980; see the whole document ---	6																					
A	EP, A, 0038393 (DE FORENEDE BRYGGERIER A/S) 28 October 1981 see the whole document ---	7,9																					
P,X	Dialog Information Services, File 351 World Patent Index 81-89, Dialog accession no. 89-319092/44, UBE Industries KK et al: "Prodn. of copper- zinc type superoxidedismutase and catalase-by treating heamolysate by	1-4,7,9																					
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>[*] Special categories of cited documents: ¹⁰</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"Δ" document member of the same patent family</p> </div> </div>																							
IV. CERTIFICATION <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; border-bottom: 1px solid black; padding: 5px;">Date of the Actual Completion of the International Search</td> <td style="width: 50%; border-bottom: 1px solid black; padding: 5px;">Date of Mailing of this International Search Report</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">18 January 1990 (18.01.90)</td> <td style="padding: 5px;">12 February 1990 (12.02.90)</td> </tr> <tr> <td style="border-bottom: 1px solid black; padding: 5px;">International Searching Authority</td> <td style="border-bottom: 1px solid black; padding: 5px;">Signature of Authorized Officer</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">European Patent Office</td> <td></td> </tr> </table>			Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	18 January 1990 (18.01.90)	12 February 1990 (12.02.90)	International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	European Patent Office														
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report																						
18 January 1990 (18.01.90)	12 February 1990 (12.02.90)																						
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer																						
European Patent Office																							

IX. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
	anionic ion exchange then by zino supporting metal chelating affinity chromatography to separate 2 components" JP 1235590, A, 890920, 8944 (BASIC) ---	
A	Dialog Information Services, File 351, World Patent Index 81-89, Dialog accession no. 86-207847/32, Nippon Kayaku KK: "New DNA to encode human super-oxidase dismutase - produced by culturing E coli transformed cDNA contg. plasmid obtd. using mRNA obtd. from human placenta" JP 61139390, A, 860626, 8632 (Basic) -----	5

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

PCT/AT 89/00099

SA 32049

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 08/11/89
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DD-A1- 252615	23/12/87	NONE	

EP-A1- 0019474	26/11/80	EP-A-B- 0019477	26/11/80
		JP-A- 56035983	08/04/81
		JP-A- 56035984	08/04/81
		US-A- 4340675	20/07/82
		US-A- 4388406	14/06/83
		AT-E- 5976	15/02/84
		AT-E- 6076	15/02/84
		US-A- 4390628	28/06/83

EP-A1- 0038393	28/10/81	JP-A- 56148287	17/11/81
		US-A- 4341867	27/07/82
		AT-E- 6077	15/02/84

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen **PCT/AT 89/00099**

I. KLASSEFIZKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben) ⁶ Nach der internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC 5 : 5 C 12 N 9/02																			
II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE Recherchierter Mindestprüfstoff ⁷ Klassifikationssystem Klassifikationssymbole : 5 C 12 N Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen ⁸																			
III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN⁹ <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;">Ar.¹⁰</th> <th style="width: 70%;">Kennzeichnung der Veröffentlichung¹¹, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile¹²</th> <th style="width: 20%;">Betr. Anspruch Nr.¹³</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>DD, A1, 252615 (KARL-MARX-UNIVERSITÄT) 23 Dezember 1987, siehe Dokument insgesamt</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>--</td> <td>1-14</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>BIOCHIMIE, Band. 60, 1978 J.L. Ochoa: "Hydrophobie (interaction) chromatography", sie Seite 1 - Seite 15</td> <td>1-4</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>EP, A1, 0019474 (DE FORENEDE BRYGGERIER A/S) 26 November 1980, siehe Dokument insgesamt</td> <td>6</td> </tr> <tr> <td></td> <td>--</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>		Ar. ¹⁰	Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch Nr. ¹³	X	DD, A1, 252615 (KARL-MARX-UNIVERSITÄT) 23 Dezember 1987, siehe Dokument insgesamt	1	Y	--	1-14	Y	BIOCHIMIE, Band. 60, 1978 J.L. Ochoa: "Hydrophobie (interaction) chromatography", sie Seite 1 - Seite 15	1-4	A	EP, A1, 0019474 (DE FORENEDE BRYGGERIER A/S) 26 November 1980, siehe Dokument insgesamt	6		--	
Ar. ¹⁰	Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch Nr. ¹³																	
X	DD, A1, 252615 (KARL-MARX-UNIVERSITÄT) 23 Dezember 1987, siehe Dokument insgesamt	1																	
Y	--	1-14																	
Y	BIOCHIMIE, Band. 60, 1978 J.L. Ochoa: "Hydrophobie (interaction) chromatography", sie Seite 1 - Seite 15	1-4																	
A	EP, A1, 0019474 (DE FORENEDE BRYGGERIER A/S) 26 November 1980, siehe Dokument insgesamt	6																	
	--																		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen¹⁰:</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> </div> <div style="width: 50%;"> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist</p> <p>"G" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p> </div> </div>																			
IV. BESCHEINIGUNG																			
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 18. Januar 1990	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts <div style="text-align: center; font-size: 1.2em; font-weight: bold;">12 FEB. 1990</div>																		
Internationale Recherchenbehörde <div style="text-align: center; font-weight: bold;">Europäisches Patentamt</div>	Unterschrift des Bevollmächtigten Bediensteten <div style="text-align: center;"> L. ROSSI </div>																		

III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)		
Art *	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch *jr.
A	EP, A1, 0038393 (DE FORENEDE BRYGGERIER A/S) 28 Oktober 1981, siehe Dokument insgesamt	7-9
--		
P, X	Dialog Information Services, File 351, World Patent Index 81-89, Dialog accession no. 89-319092/44, UBE Industries KK et al: "Prodn. of copper-zinc type superoxidedismu- tase and catalase - by treating heamolysate by anionic ion exchange then by zinc supporting metal chelating affinity chromatography to se- parate 2 components", JP 1235590, A, 890920, 8944 (Basic)	1-4, 7, 9
--		
A	Dialog Information Services, File 351, World Patent Index 81-89, Dialog accession no. 86-207847/32, Nippon Kayaku KK: "New DNA to en- code human super-oxidase dismutase - produced by culturing E coli transformed cDNA contg. plasmid obtd. using mRNA obtd. from human pla- centa", JP 61139390, A, 860626, 8632 (Basic)	5

ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT
 ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.

PCT/AT 89/00099

SA 32049

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentedokumente angegeben.
 Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am 08/11/89.
 Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DD-A1- 252615	23/12/87	KEINE	
EP-A1- 0019474	26/11/80	EP-A-B- 0019477	26/11/80
		JP-A- 56035983	08/04/81
		JP-A- 56035984	08/04/81
		US-A- 4340675	20/07/82
		US-A- 4388406	14/06/83
		AT-E- 5976	15/02/84
		AT-E- 6076	15/02/84
		US-A- 4390628	28/06/83
EP-A1- 0038393	28/10/81	JP-A- 56148287	17/11/81
		US-A- 4341867	27/07/82
		AT-E- 6077	15/02/84

EPO FORM 100(7)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☐ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.